

Japanese Patent Application Publication (JP-B) No.2-19902

Publication Date: May 7, 1990

Application No.: 55-183703

Application Date: December 26, 1980

TITLE: FILLER FOR HIGH SPEED LIQUID CHROMATOGRAPHY

Abstract:

PURPOSE: To obtain a filler for use, especially, in an aqueous medium having excellent mechanical strength, by using a copolymer in a specified range of mol ratio comprising a vinyl alcohol unit, a carboxylic acid vinyl ester unit, and a crosslinking unit having an isocyanurate ring.

CONSTITUTION: Hydrolysis and ester exchange reaction are performed on a copolymer of vinyl acetate, vinyl propionate, and the like with triallyl isocyanurate and the like. A mol fraction (a) of the vinyl alcohol unit and a mol fraction (b) of the carboxylic acid vinyl ester unit satisfy the relationship shown by formula I, which a mol fraction (c) of the crosslinking monomer unit having an isocyanurate satisfies the relationship shown by formula II. A porous filler having a particle size of  $5W12\mu$  is prepared from said copolymer. The obtained filler has enough strength to withstand the high flow speed and high pressure. its exclusion limit molecular weight lies in the range of  $10^3W8 \times 10^4$ . The filler is preferably used in an aqueous medium suitable for separation of components in blood serum and urine.

$$0.4 \leq \frac{a}{a+b} \leq 0.8$$

$$0.2 \leq \frac{3c}{a+b+3c} \leq 0.9$$

## ⑫ 特 許 公 報 (B 2)

平2-19902

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>G 01 N 30/48  
B 01 J 20/26

識別記号

S  
L

庁内整理番号

7621-2G  
6939-4G

②④公告 平成2年(1990)5月7日

発明の数 1 (全10頁)

④発明の名称 高速液体クロマトグラフィー用充填剤

前置審査に係属中

①特 願 昭55-183703

⑤公 開 昭57-108662

②出 願 昭55(1980)12月26日

③昭57(1982)7月6日

⑦発 明 者 柳 原 裕 三 神奈川県川崎市川崎区夜光1丁目3番1号 旭化成工業株式会社内

⑦発 明 者 野 口 康 二 神奈川県川崎市川崎区夜光1丁目3番1号 旭化成工業株式会社内

⑦発 明 者 本 多 允 神奈川県川崎市川崎区夜光1丁目3番1号 旭化成工業株式会社内

⑧出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

⑨代 理 人 弁理士 青 木 朗 外3名

審 査 官 須 磨 光 夫

⑩参 考 文 献 特開 昭57-30945 (J P, A)

1

## ⑥特許請求の範囲

1 主としてビニルアルコール単位 (I)、カルボン酸ビニルエステル単位 (II) 及びイソシアヌレート環を有する架橋性単量体単位 (III) からなる共重合体より成り、共重合体中の単位 (I) および (II) の割合が

$$0.4 \leq \frac{a}{a+b} \leq 0.8$$

(但し、a および b はそれぞれ全骨格中の構成単位 (I) および (II) のモル分率である) の範囲にあり、かつ構成単位 (I)、(II) 及び (III) の割合が

$$0.24 \leq \frac{3c}{a+b+3c} \leq 0.29$$

(但し、c は全骨格中の構成単位 (III) のモル分率である)

の範囲にあることを特徴とする全多孔質高速液体クロマトグラフィー用充填剤。

2 構成単位 (III) がトリアリルイソシアヌレート単位である特許請求の範囲第1項記載の充填剤。

2

## 発明の詳細な説明

本発明は高速液体クロマトグラフィー用充填剤に関し、更にくわしくは、水溶液中に溶解している分子量数万以下の成分の、ゲルパーミエーションクロマトグラフィーを主たる分離機構とする高速でかつ高度の分離または分析に適する液体クロマトグラフィー用充填剤に関する。

液体クロマトグラフィーは、固定相つまり充填剤と液体よりなる移動相に溶解している被分離成分との間の何らかの相互作用により溶出速度に差が生じることを利用した分離または分析方法である。なかでも小粒径で機械的強度の大きい充填剤を用い、溶媒を高速で通液することで高度な分離または分析を短時間に行なう方法を一般に高速液体クロマトグラフィー (以下HLCと表わす) といいい種々の分野で用いられている。

ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (以下GPCと表わす) は液体クロマトグラフィーの一種で充填剤 (以下ゲルと表わす) 内のポアより小さい分子サイズの成分はその大きさに応じてゲル内へ浸透し、大きい成分はゲルの外を素通りする原理を利用して分子サイズの大きい成分から溶

媒と共に順次溶出させる方法である。

GPCは分離または分析の際に用いる溶媒によつて有機溶媒系と水溶媒系に分類される。このうち水溶媒系のGPCは水溶性合成高分子、糖類、アミノ酸、蛋白質等の分離分析に用いることができる。中でも血清等の分析においては吸着や分配を利用した液体クロマトグラフィーにくらべて、サンプルの前処理や分析中の溶媒交換が不要であり、得られる情報量も多いことから簡便な分析方法として生化学、医学分野において注目を集めている。特に血液や尿中の分子量数万以下の成分は腎臓や肝臓の疾患あるいはがん等の症状との関連が深いといわれており、これらの成分の分離、分析に適する高速液体クロマトグラフィー用ゲル、特に水溶媒系の高速GPC用ゲルの開発が強く望まれている。

これまで水溶媒系GPC用ゲルとして、デキストランをエピクロロヒドリンで架橋して成るゲル（商品名セファデックス、ファルマシア社、スウェーデン）が知られており、よく使用されている。しかし、このゲルは分離に用いるボアが架橋の網目からなる軟質ゲルといわれるものであり、機械的強度が小さいので高速GPC用ゲルとして用いることはできなかった。

次に、例えば酢酸ビニルと1, 4-ブタンジオールジビニルエーテルの共重合体からなる粒子をケン化することにより、水溶媒系のゲルが得られることも知られている（特公昭44-20917号公報参照）。しかし当該出願の発明者であるW.Heitzも認めるように、このゲルは重合に用いた単量体の共重合性が良くない（W.Heitz, J.Chromatogr. 5337(1970) 参照）ので生成したゲルは十分な強度をもたず、HLC用として実用化することはできなかった。

更に、例えばジエチレングリコールジメタクリレートやグリシジルメタクリレートと酢酸ビニルとの共重合粒子をケン化し、そしてエピクロロヒドリンで架橋することによつて機械的強度の大きい水溶媒系ゲルが得られるといわれている（特開昭52-138077号公報参照）。しかしこのような製造方法は複雑であり、再現性良く一定の品質をもつゲルを得ることが困難である。

さらにまた、酢酸ビニルとトリアジン環構造を有する架橋剤よりなる共重合体を、少なくとも赤

外線吸収スペクトルの $1730\text{cm}^{-1}$ に見られるエステルの吸収が完全に消失するまでケン化することにより硬質ポリビニルアルコールゲルが得られることも公知である（特開昭55-58203号公報参照）。しかしながら、本発明者らの研究によるとこのような方法で得られたゲルは架橋剤の量が多い場合は被分離成分を強く吸着するためGPC用ゲルの用途が制限される。また架橋剤が少ない場合はゲルの機械的強度が小さく、機械的強度を特に必要としない粒径の大きいゲルが用いられる工業的分離、たとえば高分子水溶液の脱塩等に対しては用い得るかもしれないが、小粒径例えば平均径 $20\mu\text{m}$ 以下のゲルが高圧下で用いられる高速GPCに用いることはできない。

水溶媒系高速GPCゲルとして用いるためには、被分離成分の分子サイズに応じて厳密に制御されたボアと小粒径で十分な機械的強度を有し、親水性で水溶液中の被分離成分に対する吸着性が少ないことが必要である。

本発明者らはかかる従来技術の現状に鑑み、上記要件を満たす水溶媒系GPC用ゲルを開発すべく鋭意研究の結果、骨格に主として水酸基、エステル基およびイソシアヌレート環を有する架橋性単量体単位を含み水溶液中の分子量数万以下の成分の分離、分析に適した大きさのボアをもち、かつ高流速又は高圧に耐えられる機械的強度を兼ね備えたゲルの開発に成功し本発明をなすに至つた。

すなわち、本発明は、主としてビニルアルコール単位（Ⅰ）、カルボン酸ビニルエステル単位（Ⅱ）及びイソシアヌレート環を有する架橋性単量体単位（Ⅲ）からなる共重合体より成り、単位（Ⅰ）および（Ⅱ）の割合が下記の範囲にあり、

$$0.4 \leq \frac{a}{a+b} \leq 0.8$$

（ただし a および b はそれぞれ全骨格中の構成単位（Ⅰ）および（Ⅱ）のモル分率である）

かつ、構成単位（Ⅰ）、（Ⅱ）及び（Ⅲ）の割合が

$$0.24 \leq \frac{3c}{a+b+3c} \leq 0.29$$

（但し、c は全骨格中の構成単位（Ⅲ）のモル分率である）

の範囲にある全多孔質高速液体クロマトグラフィー用充填剤に関する。

水溶媒系高速GPC用ゲルは高流速または高圧に耐える機械的強度と親水性を兼ねそなえていなければならない。本発明のゲルの親水性は骨格中の水酸基に起因する。水酸基はカルボン酸ビニルエステルとイソシアヌレート環を有する架橋性単量体との共重合中のエステル基をエステル交換またはケン化することにより生成する。しかし本発明者らの検討の結果、エステル基をエステル交換またはケン化する割合が高くなると、ゲルの親水性は大きくなるが機械的強度が減少する傾向が見られ、エステル基の40~80%が水酸基になるように反応を行うことによつて十分な親水性が得られ、強度も大きいことがわかった。エステル交換率 $Y$  ( $0 \leq Y \leq 1$ ) は下記式(1)で表わされる。

$$Y = \frac{a}{a+b} \quad \cdots(1)$$

ここで $a$ および $b$ はそれぞれビニルアルコール単位およびカルボン酸ビニルエステル単位のモル分率、つまり単位数の割合を表わす。 $a$ 及び $b$ はゲル中の水酸基密度 ( $q_{OH}$ ) 及びイソシアヌレート環を有する架橋性単量体単位 (Ⅲ) の量から計算により求めることができる。 $q_{OH}$ はゲル単位重量あたりの (I) の量のことで、ゲルをピリジン溶媒中で無水酢酸と反応させて水酸基と反応して消費した無水酢酸の量またはゲルの重量変化を測定し、これから求めることができる。乾燥ゲル1gが1mmolの無水酢酸と反応したときの $q_{OH}$ が1meq/gである。イソシアヌレート環を有する架橋性単量体単位の種類はゲルの赤外線吸収スペクトルより知ることができ、かつその量はゲルを元素分析として得られる窒素の含有率から求められる。つまり $a$ は $q_{OH}$ から、 $b$ はゲル全体から (I) 及び (Ⅲ) の量を差し引いた値からそれぞれ求められる。ゲル中のカルボン酸ビニルエステル基の化学構造はゲルを完全にエステル交換またはケン化して生成するカルボン酸を同定することで確認できる。ゲルの製造条件が判明している場合は、原料の組成及び生成ゲルの $q_{OH}$ から $Y$ を計算することもでき。エステル交換率は好ましくは0.45~0.75の範囲にあるのがよい。 $q_{OH}$ は原料のカルボン酸ビニルエステルの種類、架橋度及びエステル交換率によつて異なるが、本発明においては通常4~10meq/gの範囲にある。このように本発明のゲルはビニルアルコール、カルボン酸ビニル

ルエステル、およびイソシアヌレート環を有する架橋性単量体の各単位を同時に骨格に含むことによつて水溶媒系高速GPC用ゲルとしてすぐれた特性を有するものである。その理由はゲル中の残エステル単位はゲルの強度維持に貢献しかつ架橋性単量体単位よりも親水性が大きいため同じ強度を架橋性単量体のみで維持する場合よりもゲルの吸着性が少なくなるためと思われる。

次にカルボン酸ビニルエステルとイソシアヌレート環を有する架橋性単量体との共重合体をエステル交換して得られるゲルにおいては、架橋性単量体を多く用いて得られたゲルの方が機械的強度は大きい。しかしながら、架橋性単量体は水酸基をもたず加水分解によつても水酸基を生じないので、架橋性単量体単位を骨格に多く含むとゲルの親水性は減少する。つまり水溶媒系高速GPC用ゲルとして用い得るためにはトリアリルイソシアヌレート環を有する架橋性単量体の量を最適の範囲にしなければならない。本発明のゲルの架橋度 (以下 $X$ と表わす) は $0.24 \leq X \leq 0.29$ の範囲にあるのがよい。 $X$ は下記式(2)で表わされる。

$$X = \frac{3c}{a+b+3c} \quad \cdots(2)$$

ここで、 $a$ 、 $b$ は前記の通りであり、 $c$ は全骨格中の前記構成単位 (Ⅲ) のモル分率を表わす。

$a$ 、 $b$ は前記の方法で求められ、 $c$ はゲル、又はエステル化したゲルの元素分析値から求められる。ゲルの製造条件が判明している場合は $a+b$ および $c$ をそれぞれ重合に用いたカルボン酸ビニルエステル及び架橋性単量体のモル数として計算すれば $X$ を容易に求めることができる。

$X$ が前記範囲にあることによつて粒径が小さくても機械的強度が十分なため、高圧または高流速での使用に耐えることができ、かつ親水性が十分なため水溶液中の被分離成分、特に蛋白質やアミノ酸を吸着しにくく水溶媒系高速GPC用ゲルとして好ましい。更に本発明のゲルが前記 $Y$ と $X$ の範囲を同時に満たすことは極めて好ましいことである。

また従来の軟質ゲルでは排除限界分子量 (以下 $M_{lim}$ と表わす) つまりゲル粒子内に浸透できない物質の最低分子量を大きくするためには、架橋度を低くして網目を広げなければならないので必然的に保水量 (以下 $W_e$ と表わす) が増大し機械

的強度が低下する欠点があつた。特に粒径が小さい場合、機械的強度低下による充填カラムの圧力損失増大等の悪影響が著しいので、通常は50 $\mu$ m以上の粒径を有する大きいゲルが用いられていた。これに対し本発明のゲルは、Mlim、に関係なく $W_2$ が0.5~2.0 g/gの範囲にあり、Mlim、の高いゲルでも高速GPCに用いることが可能である。このことは機械的強度の要求される20 $\mu$ m以下のゲルを用いる高速GPC用水溶媒系ゲルとして画期的なことである。 $W_2$ とはゲルを水と平衡にしたときにゲルが粒子内に含みうる水の量をゲル乾燥重量あたりの値として表示したものである。つまり $W_2$ はGPC作用を及ぼすゲル内の孔量の目安となる。 $W_2$ が大きくなると水中においてゲル単位体積あたりの骨格を形成する部分、つまりゲルそのものの重量%が相対的に低下する。そのため $W_2$ が大きすぎると水中においてゲルの機械的強度が低下するので、流速を高くすることができず、充填カラムの圧力損失も大きくなる。 $W_2$ が小さすぎるとGPC作用を及ぼす粒子内孔量が少なくなるのでゲルの分離性能は低下する。したがって $W_2$ が適当な範囲にあることは水溶媒系高速GPCゲルにおいては極めて重要な物性の一つである。本発明のような構造を有する水溶媒系高速GPC用ゲルの $W_2$ は0.5~2.0 g/gの範囲にあるのが好ましく、本発明のゲルの $W_2$ はこの範囲にあることが可能である。

$W_2$ は蒸留水と十分平衡にしたゲルを遠心分離器にかけてゲル表面に付着している水を除去したのち、その重量( $W_1$ )を測定しさらにそのゲルを乾燥して乾燥後の重量( $W_2$ )を求め次式によって求めることができる。

$$W_2 = \frac{W_1 - W_2}{W_2}$$

$W_2$ の値は実用上からは0.8~2.0 g/gの範囲にあるのが更に好ましい。

本発明のゲルのMlimは、 $10^3$ 以上がよい。Mlimはゲルのポア内へ浸透できない分子の分子量の下限を表わす値である。この値より小さい分子量の成分間についてはGPCによる分離が可能であるが、この値より大きい分子量の成分はゲルのポアに入れず、ゲル粒子の間隙を素通りして出て行き、分子量に関係なくほとんど同じ溶出容量をもつため、GPCによる分離はできない。Mlim

はGPCの検量線から求められる。検量線はゲルを充填したカラムについて横軸に溶出容量、縦軸に分子量の対数を目盛ったグラフに分子量既知のサンプルの測定データをプロットして得られ、縦軸にほとんど平衡な線と、それに続く負の勾配をもった線からなる。

本発明におけるMlimは、分子量既知の標準物質としてポリエチレングリコールまたはデキストランを用い、蒸留水を溶媒として求めた検量線の縦軸に平行な線の延長と、傾斜した線の延長が交わる点の縦軸の値として表わされる(第3図参照)。

Mlimが前記範囲より小さいゲルは、ごく限られた低分子物質の分離に用い得るだけなので実用的価値がない。

さらに、本発明のゲルは全多孔質の硬質ゲルであるため、乾燥状態で大きい比表面積を有する。ここで全多孔質とは粒子の内部までポアが分布している構造をいう。一般に架橋構造をもつ有機合成高分子はその高分子と親和性のある溶媒中で膨潤し、乾燥すると収縮する。膨潤時に溶媒が満たされているポアが架橋の網目だけで維持されている軟質ゲルの場合は、乾燥すると網目は広がった状態を維持できなくなつてつぶれてしまい、ポアはほとんど消失する。この場合の比表面積はほとんど粒子の外側だけの値となるため一般に1 ml/g以下の低い値を示す。一方ポアがしつかりした構造をもつ硬質ゲルの場合は乾燥してもポアは多少収縮するものの膨潤時の状態をほとんど維持する、つまりパーマネントポアを有する。したがって前記比表面積は軟質ゲルの値よりはるかに高い値を示す。本発明のゲルは通常5~1000 ml/gの比表面積を有する。比表面積の値が前記の範囲より小さいゲルは微細孔をほとんど持たない均一型の構造(軟質ゲル)をしていることを意味し、高速GPC用ゲルとして好ましくない。

比表面積の測定方法はいろいろあるが、本発明では最も一般的な窒素ガスによるBET法で求めるものとする。また比表面積測定に用いるサンプルは十分に乾燥しておかねばならない。本発明のゲルは親水性が大で乾燥しにくいので、水にぬれたゲルをアセトンと平衡にしたのち60℃以下で減圧乾燥するのがよい。

本発明のゲルは粒径が小さい場合にHCL用ゲ

ルとしてのすぐれた特性が顕著になる。本発明のゲルの平均粒径 ( $\overline{D}_w$ ) は通常  $5 \sim 20 \mu\text{m}$ 、好ましくは  $5 \sim 15 \mu\text{m}$  の範囲にあるのが良く、特に高分離能を必要とする場合は  $5 \sim 12 \mu\text{m}$  の範囲にあるのが更に好ましい。 $\overline{D}_w$  はコールターカウンター (米国コールターエレクトロニクス社) を用いて測定し、粒子径  $d_i$  の表われる頻度を  $n_i$  とすれば次式によつて表わされる。

$$\overline{D}_w = \frac{\sum (n_i d_i^3)}{\sum (n_i d_i^2)}$$

液体クロマトグラフィーにおいて充填剤を小粒径化することにより分離能が向上することは良く知られている。しかしながら、小粒径のゲルを充填したカラムに溶媒を通液した場合、大粒径のゲルを用いた場合に比べて充填層の圧力損失が大きくなる。したがつてゲルの機械的強度が小さいとゲルが変形または破壊し、異常に大きい圧力損失を生じ小粒径のゲルを用いた HLC を行なうことはできない。本発明のゲルはエステル交換率や架橋度をはじめとする諸特性の制御により機械的強度の改良に成功したので、小粒径でも高流速又は高压に耐えられる。

前記のような物性をもつ本発明のゲルは、カルボン酸ビニルエステルとイソシアヌレート環を有する架橋性単量体を

次式の範囲で用い、

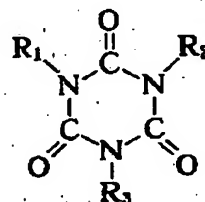
$$0.24 \leq \frac{3e}{d+3e} \leq 0.29$$

(ここで  $d$ ,  $e$  はそれぞれカルボン酸ビニルエステルとイソシアヌレート環を有する架橋性単量体のモル数)

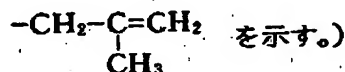
これらの単量体を溶解するが、水に溶解しにくい有機溶媒の共存下に懸濁重合を行ない、得られた粒状共重合体のエステル基の  $40 \sim 80\%$  をエステル交換またはケン化することによつて得られる。

本発明において用いられるカルボン酸ビニルエステルとは、重合可能なカルボン酸ビニルエステル基を一つ以上有する化合物のことで酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル、酪酸ビニル、吉草酸ビニルおよびヒバリン酸ビニルの中から選ばれ、単独又は二種以上の組合せで用いられる。なかでも重合やエステル交換またはケン化及び入手の容易さから酢酸ビニルやプロピオン酸ビニルが特に好ましい。

次に本発明で用いられるイソシアヌレート環を有する架橋性単量体とは下記の構造式で表わされるものである。



(ただし  $R_1, R_2$  および  $R_3$  はそれぞれ独立に  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$  又は



中でも  $R_1, R_2$  および  $R_3$  がすべて  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$  であるトリアリルイソシアヌレートは酢酸ビニルとの共重合性が良く、かつエステル交換またはケン化に対しても安定性が大きいので架橋剤として好ましい。

カルボン酸ビニルエステルやイソシアヌレート環を有する架橋性単量体以外の単量体をゲルの物性にほとんど影響しない程度に併用し共重合させることは本発明のゲルを得るうえで何ら支障ない。

また本発明ではカルボン酸ビニルエステルとイソシアヌレート環を有する架橋性単量体とを懸濁共重合させる際に、単量体を溶解するが水には溶解しにくい有機溶媒の一種以上を単量体に加えることにより、得られる共重合体にパーマネントポアを形成させると共にそのポアの孔量、孔径あるいは孔径分布を制御する。

単量体を溶解するが水に溶解しにくい有機溶媒とは、具体的には、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素、ヘプタン、オクタン、シクロヘキサン、デカリン等の脂肪族炭化水素、酢酸  $n$ -ブチル、酢酸  $iso$ -ブチル、酢酸  $n$ -ヘキシル、等のエステル化合物或いはメチルイソブチルケトン、 $n$ -ヘプタノール等のことである。

有機溶媒は単量体  $100$  重量部に対して  $20 \sim 100$  重量部の範囲で用いられる。この範囲より少ないとゲルの孔量が少なくなりすぎるため分離性能が低下し、多すぎるとゲルの機械的強度が不足するので小粒径で高圧または高流速下で用いるには好ましくない。有機溶媒の量は実用上からは  $30 \sim 90$  重



量部の範囲にあるのがよい。

共重合体の孔径あるいは孔径分布を制御するために単量体混合物に溶解する線状重合体を前記有機溶媒と併用してもよい。

単量体混合物に溶解する線状重合体とは、単量体に1重量%以上の濃度で溶解する線状重合体の中で、例えばポリ酢酸ビニルやポリスチレンの中で、単量体100重量部に対して3重量部以下で用いられる。かかる線状重合体を前記有機溶媒と併用することによつて、より孔径の大きい、即ちMlimの高いゲルを得るのが容易になる。

重合に際して用いられる開始剤は、通常の懸濁重合に用いられる一般的なラジカル重合開始剤でよく、たとえば2,2'-アゾビスイソブチロニトリル、2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)、等のアゾ系の開始剤や、過酸化ベンゾイル、過酸化ラウロイル、ジテールパーオキシド又はクメンハイドロパーオキシド等の過酸化物系の開始剤を用いることができる。

懸濁重合を行なう際には、水相にはポリビニルアルコールやメチルセルロース等の通常用いられる有機高分子系の懸濁安定剤を加えておくのがよく、必要によりリン酸ナトリウム等のpH緩衝剤を併用してもよい。懸濁安定剤の種類や量或いは攪拌速度を変えることによつて、重合によつて得られる粒状共重合体の粒径を変えることができる。

重合によつて得られた粒状共重合体を抽出して線状重合体、残留単量体あるいは有機溶媒を除いたのち、生成共重合体のエステル交換又はケン化を行なう。エステル交換反応又はケン化反応は、水やアルコールまたはその混合液を溶媒として酸またはアルカリを用いて行なわれる。ただしゲル中のすべてのエステル基がエステル交換又はケン化されてしまうまで反応を行なうと親水性の大きいゲルが得られるが、このようなゲルは必ずしも機械的強度が十分ではない。小粒径で高圧または高流速での使用に耐える親水性のゲルを得るためにはエステル交換率が0.4~0.8になるようにコントロールするのがよい。

エステル交換またはケン化反応をコントロールして前記反応率のゲルを得るには、反応溶媒、反応温度または反応時間等の反応条件と反応率との関係を事前に把握しておき、反応条件を設定するのが良い。

エステル交換反応後、得られたゲルは必要により分級を行なつてHLC用充填剤として用いることができる。

本発明のゲルは骨格に主として水酸基、エステル基、およびイソシアヌレート環を有する架橋性単量体単位を含み、水酸基が前記範囲にあり、十分な親水性を有するため、水に溶解する多くの物質に対して吸着性を示さない。したがつて水溶性合成高分子、糖類、あるいは蛋白質等の分離、分析において、溶出容量と分子量の対数の関係がほとんど直線またはなめらかな曲線である検量線をもつ。つまり水溶媒系GPCゲルとして使用できる。ただし本発明のゲルを用いた血清や尿等の多種の成分よりなるサンプルの分析ではゲルに弱く吸着されて溶出容量が分子量から予想される値よりも大きい値を示す成分も見出され、そのために実に多数のピークが検出される。しかもアルブミン等の蛋白質に対してはほとんど吸着性を示さず分子量に相当する溶出容量で溶出せしめる。そのため、本発明のゲルを用いた血清や尿の分析は除蛋白を必要とせず極めて簡単に行なえかつ多くの情報が得られる。本発明のゲルは水酸基、エステル基およびイソシアヌレート環を有する架橋性単量体単位が適当な割合で含まれるため、本来のねらいである分子の大きさに基づく分離作用に加えて適度な吸着性が与えられてこのような良好な分離が実現されたものと推定される。

さらに本発明のゲルはこのような化学構造を有すると共に、前記範囲にコントロールされた $W_g$ をもち、極めて大きい機械的強度を有する。そのため小粒径において高圧、高流速に耐えられる。水溶媒系高速GPC用ゲルは、少なくとも(1)ゲル内にポアを有し、(2)吸着性が少なく、(3)小粒径で高圧または高流速に耐える機械的強度を有することが必要である。本発明のゲルはこれらの条件を満たすものであるが、この特性はXおよびエステル交換率が前記範囲を満たすことによつて得られる。

たとえば特開昭55-58203号公報に示されているようなXが低く、赤外線吸収スペクトルで1730  $\text{cm}^{-1}$ の吸収が完全に消失したビニルアルコールとトリアリルイソシアヌレートの共重合体の構造をもつゲルでは上記のようなすぐれた分離特性および機械的強度を発揮することができず、HCL用

充填剤としては不適當であるといわざるを得ない。

また本発明のゲルは通常、分子量数万以下の成分のGPC分離に適するポアをもつ。したがって、水溶性合成高分子、糖類、あるいは蛋白質等の分離、分析だけでなく、腎臓や肝臓の疾患あるいはがん等の症状と関連が深いといわれている血液や尿中の分子量数十～数万の成分の分析に用い得る。しかも前記の高速GPCゲルとしてのすぐれた特性をもつため、これらの分析を短時間に行ない、かつ多くの情報を得ることができる。

本発明ゲルは通常カラムに充填された状態で用いられる。カラムは通常ステンレス製の円筒状のものが用いられるが目的に応じて任意に選ぶる。

以下に本発明の実施例を説明するが、本発明の範囲をこれらの実施例に限定するものではないことはいうまでもない。

#### 実施例 1

酢酸ビニル100g、トリアリルイソシアヌレート32.2g ( $X=0.25$ )、酢酸n-ブチル100g及び2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル3.3gよりなる均一混合液と、ポリビニルアルコール1重量%、リン酸二水素ナトリウム二水和物0.05重量%およびリン酸水素二ナトリウム十二水和物1.5重量%を溶解した水800mlとを、2ℓフラスコに入れ、十分攪拌したのち65℃で18時間、さらに75℃で5時間加熱攪拌して懸濁重合を行ない粒状共重合体を得た。戸過、水洗、次いでアセトン抽出後、カセイソーダ47g及びメタノール2ℓよりなる溶液中で15℃で20時間、共重合体のエステル交換反応を行なった。得られた粒子分級して平均粒径( $\overline{D}_w$ ) 10.0 $\mu$ mのゲルを得た。 $\overline{D}_w$ の測定はコールターカウンターZB型(米国コールターエレクトロニクス社)で行なわれた。前記方法で水酸基密度( $q_{OH}$ )を求めたところ、7.3meq/gエステル交換率0.64であつた。反応後のゲルの赤外線吸収スペクトルでも骨格にエステルが残っていることが確認された。またゲルの保水量( $W_R$ )は1.58g水/g乾燥ゲルで、比表面積は95ml/gであつた、このゲルを内径7.5mm、長さ50cmのステンレス製カラムに充填して種々の分子量をもつデキストランやポリエチレングリコールの水溶液を測定したところ、それぞれ分子量の大きい順に溶

出され、GPCによる分離が行なわれていることが確認された。デキストランの排除限界分子量は約 $3 \times 10^4$ であつた。また0.3M塩化ナトリウムおよび0.1Mリン酸ナトリウムを含む水溶液を溶媒として $\gamma$ -グロブリン、牛血清アルブミン、卵白アルブミンミオグロビンの分析を行なったところ分子量の大きい順に、かつほとんど100%の回収率で溶出された。サンプルの測定はすべて流速1ml/minで実施し、いずれも20分以内に分析を終了した。さらに人血清の凍結乾燥品を溶解したサンプル液を分析したところ、第1図のチャートが得られた。第1図のチャートにおいて、ピークAは主としてアルブミン、ピークBはクレアチニン、ピークCは尿酸を示す。ゲルに対し弱い吸着性をもつために用いたカラムの空塔容積よりも大きい溶出容量で溶出する成分もあるが $\gamma$ -グロブリンおよびアルブミンが溶出した後、多数の成分が分離、検出された。

#### 実施例 2

酢酸ビニル100g、トリアリルイソシアヌレート32.2g ( $X=0.25$ )、トルエン40gおよび2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル3.3gよりなる均一混合液を実施例1と同様に懸濁重合し、得られた粒子のエステル交換反応を行なった(ただし反応は40℃で行なった)。得られたゲルの物性は $\overline{D}_w=9.5\mu$ m、 $q_{OH}=9.0\text{meq/g}$ (エステル交換率0.74)、 $W_R=1.0\text{g/g}$ および比表面積は38ml/gであつた。このゲルを実施例1と同様にカラムに充填しポリエチレングリコールを分析したところ、それぞれ分子量の大きい順に溶出することが確認され、 $M_{lim}$ は $1.9 \times 10^3$ であつた。サンプルの測定はすべて流速1ml/minで実施し、いずれも20分以内に分析を終了した。さらに血清の凍結乾燥品を溶解したサンプル液を分析したところ第2図のチャートが得られ多数の成分を分離検出できることが確認した。第2図のチャートにおいて、ピークAは主としてアルブミン、ピークBはクレアチニン、ピークCは尿酸を示す。

#### 実施例 3

酢酸ビニル100g、トリアリルイソシアヌレート37.5g ( $X=0.28$ )、酢酸n-ブチル100g、ポリ酢酸ビニル(重合度約500)4.1gおよび2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル3.4gよりなる均一混合液を実施例1と同様に懸濁重合し、得ら



れた粒子のエステル交換反応を行なった。(ただし反応時間は15時間とした) 得られたゲルの物性は $\bar{D}_w=9.1\mu\text{m}$ 、 $q_{\text{OH}}=5.1\text{meq/g}$  (エステル交換率0.50)、 $W_r=1.46\text{g/g}$  および比表面積 $86\text{m}^2/\text{g}$  であつた。このゲルを実施例1と同様にカラムに充填し、ポリエチレングリコール、デキストランあるいは $\gamma$ -グロブリン等の蛋白質を分析したところ、それぞれ分子量の大きい順に溶出し、蛋白質はほとんど100%の回収率で溶出されることが確認され、デキストランのMlimは $8 \times 10^4$ であつた。サンプルの測定はすべて流速 $1\text{ml/min}$ で実施し、いずれも20分以内に分析を終了した。

#### 実施例 4

プロピオン酸ビニル116g、トリアリルイソシアヌレート39.4g ( $X=0.29$ )、酢酸n-ブチル62gおよび2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル3.9gよりなる均一混合液を実施例1と同様に懸濁重合し、得られた粒子のエステル交換反応を行なった(ただし、反応は $40^\circ\text{C}$ で行なつた)。得られたゲルの物性は $\bar{D}_w=10.8\mu\text{m}$ 、 $q_{\text{OH}}=7.7\text{meq/g}$  (エステル交換率0.72)、 $W_r=1.30\text{g/g}$  および比表面積 $52\text{m}^2/\text{g}$  であつた。このゲルを実施例1と同様にカラムに充填し、ポリエチレングリコール、デキストランあるいは $\gamma$ -グロブリン等の蛋白質を分析したところ、それぞれ分子量の大きい順に溶出し特に蛋白質はほとんど100%の回収率で溶出されることが確認された。デキストランのMlimは $2 \times 10^4$ であつた。サンプルの測定はすべて流速 $2\text{ml/min}$ で実施し、いずれも10分以内に分析を終了した。

#### 比較例 1

実施例1においてケン化反応をメタノール-水混合溶媒中にて $60^\circ\text{C}$ で20時間行なつた以外は実施例1と同様に行なつてゲルを得た。ゲルの物性は $\bar{D}_w=9.7\mu\text{m}$ 、 $q_{\text{OH}}=13.5\text{meq/g}$  (ケン化率0.98) 及び $W_r=1.95\text{g/g}$  であつた。ゲルの赤外線吸収スペクトルによると $1730\text{cm}^{-1}$ のエステル基に基づく吸収は完全に消失していた。ゲルを実施例1と同様にカラムに充填し、同様のクロマト条件で分析を試みたところ、カラムの圧力損失が高くなり測定できなかつた。ゲルの強度が不十分なためである。

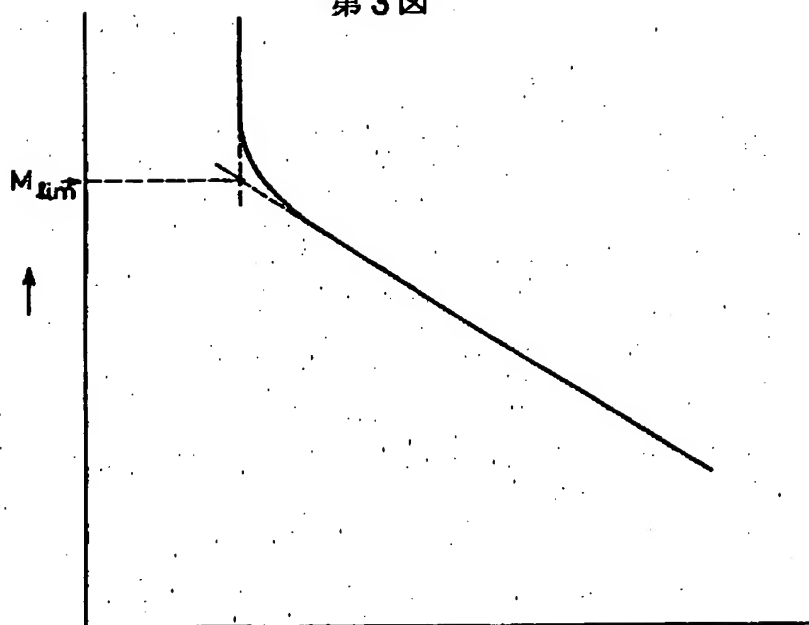
#### 比較例 2

実施例1においてトリアリルイソシアヌレートを24.1g ( $X=0.20$ ) 用いケン化反応をメタノール-水混合液中で $60^\circ\text{C}$ で行なつた以外は実施例1と同様に行なつてゲルを得た。ゲルの物性は $\bar{D}_w=10.2\mu\text{m}$ 、 $q_{\text{OH}}=14.2$  (ケン化率0.95) 及び $W_r=2.15\text{g/g}$  であつた。ゲルの赤外線吸収スペクトルによると $1730\text{cm}^{-1}$ のエステルの吸収は完全に消失していた。このゲルをカラム充填し実施例1と同様のクロマト条件で分析を試みたところカラムの圧力損失が高くなり測定できなかつた。ゲルの強度が不十分なためである。

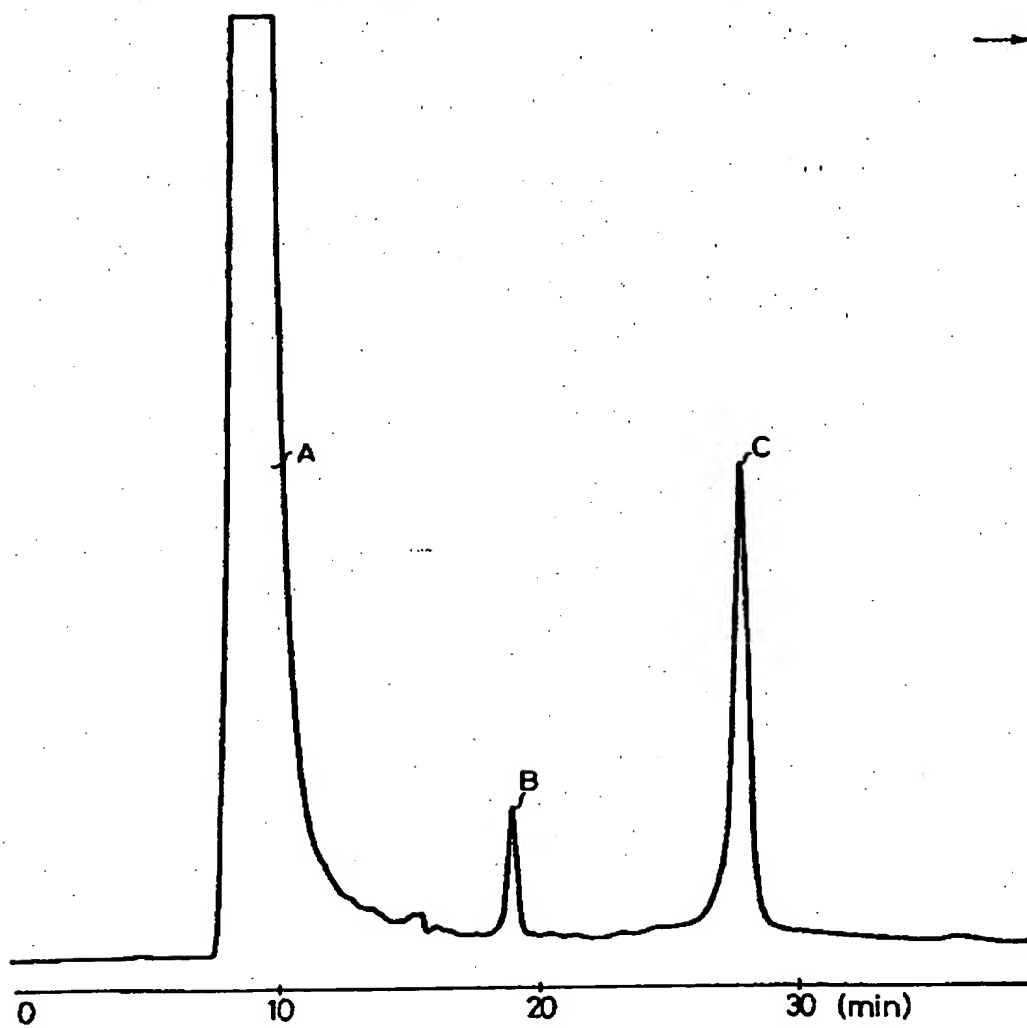
#### 図面の簡単な説明

- 第1図は実施例1のゲルを用いた高速液体クロマトグラフィーにより人の血清の凍結乾燥品を溶解したサンプル水溶液を分析して得られたチャート図である。第2図は実施例2のゲルを用い第1図の場合と同様にして得たチャート図である。第3図はGPCの検量線及びその検量線からのMlimの求め方を示すグラフ図である。

第3図



第1図



第 2 図

